

# ***TREBALL DE RECERCA***

***Influència dels serotips dels *Streptococcus pneumoniae* en  
l'evolució clínica de les pneumònies.***

***Departament de Medicina / Universitat Autònoma de Barcelona***

***Autor: Yolanda Galea Colón***

***Director: Dr. Gabriel Sampol***

***Convocatòria: setembre de 2012***



## ÍNDEX

|    |                                 |    |
|----|---------------------------------|----|
| 1. | <i>Resum</i> .....              | 3  |
| 2. | <i>Introducció</i> .....        | 5  |
| 3. | <i>Material i mètodes</i> ..... | 9  |
| 4. | <i>Resultats</i> .....          | 13 |
| 5. | <i>Discussió</i> .....          | 15 |
| 6. | <i>Conclusions</i> .....        | 19 |
| 7. | <i>Taules i figures</i> .....   | 21 |
| 8. | <i>Bibliografia</i> .....       | 27 |



## RESUM

En els adults, la influència dels serotips dels *Streptococcus pneumoniae* (Sp) en la mortalitat de les pneumònies pneumocòcciques continua sent poc clara.

Objectiu: Descriure les característiques clíniques dels pacients adults amb pneumònia causada per Sp aïllats en mostres invasives i la influència dels serotips amb elevada capacitat de causar malaltia invasiva en l'evolució clínica d'aquestes.

Mètode: Estudi retrospectiu en el que es descriuen les característiques clíniques i les complicacions dels pacients amb pneumònia pneumocòccica. Les mostres es processen mitjançant el sistema BacT-Alert1 i les soques s'envien al Laboratori de Referència. Els serotips es divideixen en 2 grups: l'E on s'inclouen els serotips amb elevada capacitat de causar malaltia invasiva i l'X on s'inclou a la resta.

Resultats: Entre gener de 2008 i desembre de 2010, s'aïllen 82 soques de Sp, 34 del grup E. Dels 82 pacients, un 58.5% són homes, i l'edat mitja és 56,1 anys ( $\pm 17.9$ ), amb una edat mitja del grup E de 48.4 anys i la del grup X de 61.6 anys ( $p=0,003$ ). No hi ha diferències en relació a comorbiditats i evolució clínica, excepte en l'estada mitja hospitalària que és menor al grup X ( $p=0,002$ ) i la mortalitat que és més baixa en el grup E ( $p=0,022$ ).

Conclusió: Les pneumònies pneumocòcciques causades pels serotips del grup E infecten a persones més joves, comporten major estada hospitalària i menor mortalitat. L'edat avançada i la malaltia cardíaca són factors de risc de mortalitat, mentre que els serotips del grup E són factors protectors.



## INTRODUCCIÓ

La malaltia pneumocòccica és endèmica a tot el món. L'*Streptococcus pneumoniae* és un dels patògens humans més rellevants i és un dels microorganismes més prevalents de l'aparell respiratori, essent la nasofaringe el seu principal reservori on pot romandre com a portador, durant mesos, sense comportar malaltia (situació més freqüent) o progressar cap a aquesta. Durant més d'un segle, aquest patogen ha estat la causa més freqüent d'otitis mitja aguda, sinusitis i pneumònia, i una de les causes més importants de meningitis bacteriana<sup>1</sup>.

L'*Streptococcus pneumoniae* és l'agent etiològic que causa més pneumònies a nivell mundial, i el que comporta més hospitalització en els adults i més mortalitat<sup>2-3</sup>. Es calcula que entre un 30-50% de les pneumònies adquirides a la comunitat poden estar causades per *Streptococcus pneumoniae* i que el 80% d'aquestes cursen sense bacterièmia<sup>4</sup>.

Malgrat les millores en el diagnòstic etiològic, en el tractament antibiòtic i en el suport, les taxes de mortalitat en pacients amb pneumònia pneumocòccica continuen essent altes i van des del 5% al 35% a nivell mundial, i al voltant del 25% a Catalunya<sup>3, 5 i 6</sup>

L'epidemiologia de la malaltia pneumocòccica ha canviat constantment i ha augmentat dramàticament en els últims anys, arreu d'Europa<sup>7- 9</sup>. Aquestes variacions s'atribueixen, principalment, a la millora en les tècniques de cultiu i als canvis en els patrons d'hospitalització, que han comportat un increment en el nombre anual d'hemocultius realitzats<sup>10</sup>. No obstant això, l'augment pot

representar un veritable augment en la incidència de la bacterièmia pneumocòccica<sup>11</sup>.

La incidència de la malaltia invasiva pneumocòccica a Catalunya l'any 2008 va ser de 13.9 per cada 100.000 persones/any, essent en els majors de 65 anys de 29.8 per cada 100.000 persones/any, i la pneumònia va ser la forma més freqüent de malaltia invasiva pneumocòccica (78%)<sup>12</sup>.

Hi ha molts factors que influeixen en l'òptima resposta immune contra la infecció, essent els factors de l'hoste els més estudiats. L'edat, les malalties cròniques i la immunosupressió són factors independents associats a la mortalitat de la malaltia pneumocòccica<sup>13</sup>.

Per altre banda, l'associació entre els diferents serotips dels *Streptococcus pneumoniae* i la gravetat de la pneumònia no ha estat ben establerta.

En l'actualitat, es coneixen 92 serotips que es diferencien per la seva càpsula polisacàrida<sup>14</sup>. Aquesta variabilitat capsular permet l'evasió immune del pneumococ, mitjançant la prevenció de la fagocitosi en individus no immunes i, per altra banda, la quantitat de polisacàrid capsular es correlaciona amb la virulència<sup>15</sup>.

Brueggemann et al. va descriure, en la població pediàtrica, el potencial dels diferents serotips de *Streptococcus pneumoniae* per causar malaltia invasiva. Els serotips 1, 5 i 7F (o serotips amb elevada capacitat de causar malaltia invasiva) es van considerar serotips que estranyament colonitzen l'orofaringe però que comunament causen bacterièmia, i els serotips 3, 6A, 6B, 8, 19F i 23F es van



definir com a serotips amb baixa capacitat de causar malaltia invasiva, que solen ser colonitzadors i rarament comporten bacterièmia<sup>16</sup>.

L'objectiu d'aquest estudi és descriure les característiques dels pacients diagnosticats de pneumònia pneumocòccica, amb l'aïllament de *l'Streptococcus pneumoniae* en una mostra invasiva, a un Hospital General Bàsic, i la influència dels serotips amb elevada capacitat de causar malaltia invasiva en l'evolució clínica de les pneumònies i la mortalitat.



## MATERIAL I MÈTODES

Estudi retrospectiu en el qual es van incloure pacients adults amb el diagnòstic de pneumònia pneumocòccica i l'aïllament d'*S. pneumoniae* en una mostra invasiva, entre gener de 2008 i desembre de 2010.

**Població d'estudi:** L'Hospital General de Granollers és un hospital general bàsic que pertany a la Xarxa Hospitalària d'Utilització Pública (XHUP) i cobreix una població de referència de 400.000 habitants.

En aquest estudi es van incloure tots aquells individus majors de 18 anys que van acudir al Servei d'Urgències de l'Hospital durant 3 anys naturals consecutius, anteriorment citats, i que van complir els següents criteris: a/ haver estat diagnosticats de pneumònia, que es va definir com un quadre clínic de febre i tos, amb una radiografia de tòrax en la que es va objectivar una condensació alveolar, i b/ el creixement de *Streptococcus pneumoniae* en hemocultiu o cultiu de líquid pleural.

**Obtenció de mostres:** Extracció d'hemocultius i realització de toracocentesi per al cultiu de líquid pleural. Aquestes mostres es van enviar al laboratori de l'Hospital i es van processar mitjançant el sistema de BacT-Alert1. Després de l'aïllament de l'*Streptococcus pneumoniae* en els cultius de sang i líquid pleural, es van enviar al Laboratori de Referència del Pneumococ (Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Espanya) per a la verificació de la sensibilitat als antibiòtics i la serotipificació mitjançant la reacció de Quellung i/o punt d'assaig de transferència, amb l'ús de antisèrums proporcionada pel Statens Serum Institute (Copenhaguen, Dinamarca).

### **Variables d'estudi:**

Antecedents personals i comorbiditats: edat; sexe; hàbit tabàquic, considerant fumador a aquell que ha fumat algun cigarret en l'últim mes, exfumador a la persona que havent estat fumadora, portava un mínim d'un any sense fumar, i no fumador a aquell que no ha fumat mai; enolisme, al consum d'alcohol diari superior a 60g; Diabetis Mellitus (tractament amb hipoglicèmians orals o insulines); Malaltia cardíaca (cardiopatia isquèmica, valvular o història de descompensacions d'insuficiència cardíaca); Malaltia pulmonar obstructiva crònica (dispnea i criteris clínics de bronquitis crònica simple o una espirometria amb un FEV1% <70%); Malaltia hepàtica crònica o cirrosi; Malaltia renal crònica (creatinines > 1.5mg/dL) i Immunosupressió (infecció per VIH, esplenectomia, trasplantament, malalties hematològiques i neoplàsies si estaven en tractament amb quimioteràpia).

Tipus de serotips: Els diferents serotips dels *Streptococcus pneumoniae* es van dividir, seguint la classificació de Brueggemann et al., en dos grups: el grup E, on es van incloure els serotips amb elevada capacitat de causar malaltia invasiva (1, 5 i 7F), i el grup X en el qual es van englobar la resta de serotips.

Variables evolutives del quadre clínic: embassament pleural, objectivat mitjançant una prova d'imatge, requeriment de drogues vasoactives, ventilació mecànica (invasiva o no invasiva), dies d'estada mitja hospitalària, i mortalitat.

### **Anàlisi estadística:**

Els resultats de las variables contínues s'expressen com a mitja +/- desviació estàndard, i les variables categòriques en percentatges.

Es va fer servir la prova de Chi-quadrat o la prova exacta de Fisher per comparar proporcions entre els grups i la t d'Student per comparar les mitges.

Es va considerar un nivell de significació estadística a dues cues quan  $\alpha < 0.05$ .

L'anàlisi de les dades es va realitzar utilitzant el paquet estadístic R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; versió 2.14.0).



## RESULTATS

Entre gener de 2008 i desembre 2010 es van diagnosticar a 82 pacients de pneumònia pneumocòccica amb aïllament d'*Streptococcus pneumoniae* en mostres invasives.

Un 58.5% dels casos van ser homes. L'edat mitja va ser 56.11 anys (+/- 17.9), amb un rang entre 21 anys i 96 anys. Pel que fa als hàbits tòxics, 37.5% van ser fumadors actius, 21.2% exfumadors i 12.5% consumidors de més de 60g/d d'alcohol. En quant a les comorbiditats, 22.2% van ser diabètics, 12.3% patien malaltia respiratòria crònica, 18.5% cardiopatia crònica, 16% malaltia hepàtica crònica, 3.70% malaltia renal crònica i 22% van ser immunodeprimits. A la taula 1 es comparen les característiques clíniques dels pacients, en funció del serotip detectat. Únicament, es van trobar diferències significatives en l'edat, essent més joves els pacients amb aïllament d'un serotip del grup E.

En un dels 82 pacients no consten antecedents patològics, en ser èxits a les poques hores d'arribar a l'hospital.

Dels 82 serotips d'*Streptococcus pneumoniae*, 75 es van aïllar en hemocultiu i 10 en líquid pleural. Cal destacar que en tres pacients, el pneumococ, va créixer tant en mostra de sang com de líquid pleural. El serotip que es va isolar amb més freqüència va ser l'1 (25.61%), seguit del 3 i 7F (10.98%) i el 19A (7.32%). Del total d'*Streptococcus pneumoniae* aïllats, un 41.46% van quedar inclosos al grup E (gràfiques 1 i 2). Pel que fa a les complicacions, l'embassament pleural va ser la més freqüent, presentant-se en un 32.9% dels pacients. Un 10.9% dels pacients

van requerir drogues vasoactives i un 12.19% ventilació mecànica, sense trobar diferències significatives entre els 2 grups.

L'estada mitja hospitalària va ser de 10.08 dies, amb diferències significatives entre ambdós grups. La del grup E va ser d'11.53 dies, mentre que la del grup X va ser de 9.10 dies (*p-value*= 0.002) .

La mortalitat global va ser del 13.41%, essent menor al grup E (serotips amb elevada capacitat de causar malaltia invasiva) respecte a la del grup X (*p-value*= 0.022). A la taula 2 es comparen les diferents variables d'evolució clínica dels pacients, en funció del grup de serotip al que pertanyen.

En una tercera taula (taula 3) es recull el risc de morir-se, tenint en compte els possibles factors de risc que influeixen en l'evolució clínica i els factors microbiològics, destacant l'edat i la malaltia cardíaca com a factors de risc i els serotips inclosos al grup E com a factors protectors.



## DISCUSSIÓ

En el nostre estudi, les pneumònies pneumocòcciques causades pels serotips del grup E, o amb elevada capacitat de causar malaltia invasiva, infecten a persones més joves i comporten menor mortalitat que la resta de serotips. Per altra banda, el serotip que s'aïlla amb més freqüència és el serotip 1, seguit pels serotips 3 i el 7F en segona posició (aquest tres serotips són els responsables del 48% de les pneumònies de l'estudi).

L'aïllament del serotip 1, com el més freqüent en mostres invasives, també es descriu a l'estudi de Lujan et al.<sup>17</sup>, amb una proporció del 18.9%, essent els serotips 3 (12.3%) i 14 (7.6%) els següents en freqüència. En canvi, en un altre estudi català de Garcia-Vidal et al.<sup>18</sup>, en el que s'isolen els serotips d'*Streptococcus pneumoniae* en mostres invasives i no invasives, el serotip que s'identifica amb més freqüència és el serotip 3 (25.4%), seguit dels serotips 1 (9%) i 14 (5.2%). I Imohl et al.<sup>19</sup> en població alemanya i Bewick et al.<sup>20</sup> en pacients britànics, aïllen amb més freqüència el serotip 14 (16.7% i 19% respectivament), en mostres invasives i no invasives al primer estudi, i únicament en invasives en el segon.

Pel que fa a les investigacions de la mortalitat de les pneumònies pneumocòcciques, principalment, s'han centrat en els factors de risc de l'hoste com l'edat, els hàbits tòxics les malalties cròniques i la immunosupressió, i pocs en la possible influència dels serotips de l'*Streptococcus pneumoniae*.

La majoria d'estudis que han tractat la influència dels serotips, sobre l'evolució clínica de la malaltia pneumocòccica, s'han realitzat en la malaltia pneumocòccica

invasiva bacterièmica. Alguns autors han demostrat una relació entre els serotips i la mortalitat. Harboe et al.<sup>21</sup>, recolzen la hipòtesi que determinats serotips de pneumococs s'associen de forma significativa i independentment, a la mortalitat a curt termini. En el seu estudi els serotips 3 i 19A s'associen amb una alta mortalitat en nens grans i adults, en comparació amb el serotip de referència (serotip 1).

Martens et al.<sup>22</sup>, en un estudi retrospectiu amb 464 pacients amb malaltia pneumocòccica invasiva bacterièmica, postula que els serotips capsulars 1 i 3 prediuen l'evolució de la malaltia invasiva, independentment de l'edat i altres marcadors de gravetat de la malaltia; amb riscos relatius de mortalitat de 2.54 (95% C.I: 1.22-5.27) per al serotip 3 i del 0.23 (95% C.I: 0.23-0.97) per al serotip 1; mentre que quan descriuen la influència dels serotips en l'evolució clínica de les pneumònies pneumocòcciques amb bacterièmia, únicament observen una tendència d'aquests resultats (*p-value*= 0.06).

D'acord amb els nostres resultats, Weinberger et al.<sup>23</sup>, en una metaàlisi en el que inclouen 9 estudis, troben diferències significatives pel que fa a la mortalitat en estimacions de risc relatiu (RR) entre els serotips en pacients amb pneumònia bacterièmica; els serotips 1, 7F i 8 s'associen a disminucions del RR, i els serotips 3, 6A, 6B, 9N, i 19F a l'augment del RR.

Lujan et al.<sup>17</sup>, en un estudi amb quasi 300 pacients, observen que els serotips amb baixa capacitat de causar malaltia invasiva comporten més mortalitat en les pneumònies pneumocòcciques bacterièmiques (*p-value* <0.001) i que els serotips amb elevada capacitat de causar malaltia invasiva afecten en gent més jove.

Contràriament, Alanee et al.<sup>13</sup>, en un estudi multicèntric amb quasi 800 pacients, analitza la mortalitat de diferents grups de serotips (serotips invasius, serotips pediàtrics i serotips conjugats), sense trobar una associació significativa amb la mortalitat, i reflexa que els factors de l'hoste i la gravetat de la malaltia són factors independents que sí s'associen significativament amb la mortalitat.

La principal limitació del nostre estudi és la mida de la mostra, que comporta unes limitacions estadístiques a l'estratificar pels diferents grups de serotips. Tot i així, creiem que l'exhaustivitat en la recollida de dades, incloent la totalitat dels casos observats en un hospital amb cobertura de 400.000 habitants, i la qualitat de les tècniques microbiològiques emprades, proporciona dades rellevants per la nostra població.

Una possible hipòtesi de l'aplicabilitat dels nostres resultats, que alhora pot ser la base de futures investigacions, seria el disseny de properes vacunes antipneumocòcciques. En el nostre estudi, els serotips que s'han definit com d'elevada capacitat de causar malaltia invasiva comporten menor mortalitat que la resta i infecten a persones més joves. Per tant, caldria donar més rellevància a aquells serotips amb menor capacitat de causar malaltia invasiva i valorar la inclusió de diferents serotips en les vacunes en funció de l'edat de la població diana.



## CONCLUSIONS

La pneumònia pneumocòccica es va associar a nombroses complicacions i una elevada mortalitat. Els serotips amb elevada capacitat de causar malaltia invasiva, van infectar a individus més joves, van comportar una estada mitja hospitalària major i es van associar a menys mortalitat que els serotips d'*Streptococcus pneumoniae* amb menor capacitat de causar malaltia invasiva. L'edat avançada i la malaltia cardíaca van resultar ser factors de risc de mortalitat, mentre que els serotips del grup E van ser factors protectors.



## TAULES I FIGURES

Taula 1: Descriptiva de la població d'estudi estratificada pels grups de serotips E i X entre el període 2008-2010.

Taula 2: Descriptiva de l'evolució clínica de la població d'estudi estratificada pels grups de serotips E i X entre el període 2008-2010.

Taula 3: Model univariant per a la mortalitat, incloent els possibles factors de risc que poden influir en l'evolució clínica i els factors microbiològics.

Figura 1: Distribució de tots els serotips aïllats d'*Streptococcus pneumoniae*.

Figura 2: Distribució de tots els serotips aïllats d'*Streptococcus pneumoniae* per grups.

Taula 1: Descriptiva de la població d'estudi estratificat pels dos serotips estudiat E i X entre el període 2008-2010.

|                       | GRUP E<br>(n=34) | GRUP X<br>(n=48) | <i>p-value</i> |
|-----------------------|------------------|------------------|----------------|
| SEXE                  |                  |                  | 0.786          |
| Homes                 | 21 (61.8%)       | 27 (56.2%)       |                |
| Dones                 | 13 (38.2%)       | 21 (43.8%)       |                |
| EDAT                  | 48.4 (18.9)      | 61.6 (19.8)      | 0.003          |
| TABAQUISME            |                  |                  | 0.233          |
| Mai fumadors          | 11 (33.3%)       | 22 (46.8%)       |                |
| Fumadors actius       | 16 (48.5%)       | 14 (29.8%)       |                |
| Exfumadors            | 6 (18.2%)        | 11 (23.4%)       |                |
| ENOLISME              |                  |                  | 0.151          |
| No enolisme o < 60g/d | 31 (93.9%)       | 37 (78.7%)       |                |
| Exenolisme > 60g/d    | 0 (0.00%)        | 2 (4.3%)         |                |
| Enolisme > 60g/d      | 2 (6.1%)         | 8 (17.0%)        |                |
| DIABETES              | 6 (17.6%)        | 12 (25.5%)       | 0.568          |
| M. CARDÍACA           | 4 (11.8%)        | 11 (23.4%)       | 0.298          |
| MPOC                  | 4 (11.8%)        | 6 (12.8%)        | 1              |
| M. HEPÀTICA           | 2 (5.9%)         | 11 (23.4%)       | 0.070          |
| M. RENAL              | 3 (8,8%)         | 0 (0 %)          | 0.070          |
| IMMUNOSUPRESSIÓ       | 6 (17.65%)       | 12 (25%)         | 0.155          |



Taula 2: Descriptiva de l'evolució clínica de la població d'estudi estratificada pels grups de serotips E i X entre el període 2008-2010.

|                     | GRUP E<br>(n= 34)    | GRUP X<br>(n= 48)  | <i>p-value</i> |
|---------------------|----------------------|--------------------|----------------|
| EMBASSAMENT PLEURAL | 14 (41.2%)           | 13 (27.1%)         | 0.273          |
| DROGUES VASOACTIVES | 4 (11.8%)            | 5 (10.4%)          | 1.00           |
| VENTILACIÓ MECÀNICA | 6 (17.6%)            | 4 (8.3%)           | 0.305          |
| ESTADA MITJA        | 11.53 ( $\pm$ 12.91) | 9.10 ( $\pm$ 7.97) | 0.002          |
| EXITUS              | 1 (2.9%)             | 10 (20.8%)         | 0.022          |

Taula 3. Model univariant per a la mortalitat, incloent els possibles factors de risc que poden influir en l'evolució clínica i els factors microbiològics.

|                       | OR (IC 95%)        | <i>p- value</i> |
|-----------------------|--------------------|-----------------|
| EDAT                  |                    |                 |
| > 65 anys             | 6.80 (1.64-25.25)  | 0.008           |
| variable continua     | 1.08 (1.04-1.15)   | 0.001           |
| SEXE                  |                    |                 |
| Dona                  | 1 (Ref)            |                 |
| Home                  | 0.83 (0.23-2.97)   | 0.073           |
| TABAQUISME            |                    |                 |
| Mai fumadors          | 1 (Ref)            |                 |
| Fumadors actius       | 0.40 (0.07-2.24)   | 0.297           |
| Exfumadors            | 1.20 (0.25-5.76)   | 0.820           |
| ENOLISME              |                    |                 |
| No enolisme o < 60g/d | 1 (Ref)            |                 |
| Enolisme > 60g/d      | 2.18 (0.38-12.36)  | 0.379           |
| Exenolisme > 60g/d    | 8.71 (0.49-155.24) | 0.141           |
| DIABETES              | 1.60 (0.37-6.94)   | 0.530           |
| M. CARDÍACA           | 6.10 (1.49-24.95)  | 0.012           |
| MPOC                  | 1.97 (0.35-10.94)  | 0.439           |
| M. HEPÀTICA           | 1.36 (0.25-7.30)   | 0.717           |
| M. RENAL              | 0 (0.00- inf)      | 0.995           |
| IMMUNOSUPRESSIÓ       | 0.86 (0.17-4.46)   | 0.857           |
| EMBASSAMENT PLEURAL   | 0.41 (0.08-2.04)   | 0.276           |
| DROGUES VASOACTIVES   | 4.06 (0.85-19.50)  | 0.080           |
| VM                    | 3.43 (0.74-15.98)  | 0.117           |
| SEROTIPS              |                    |                 |
| Grup X                | 1(Ref)             |                 |
| Grup E                | 0.12 (0.01-0.95)   | 0.040           |

Figura 1: Distribució de tots els serotips aïllats d'*Streptococcus pneumoniae*.

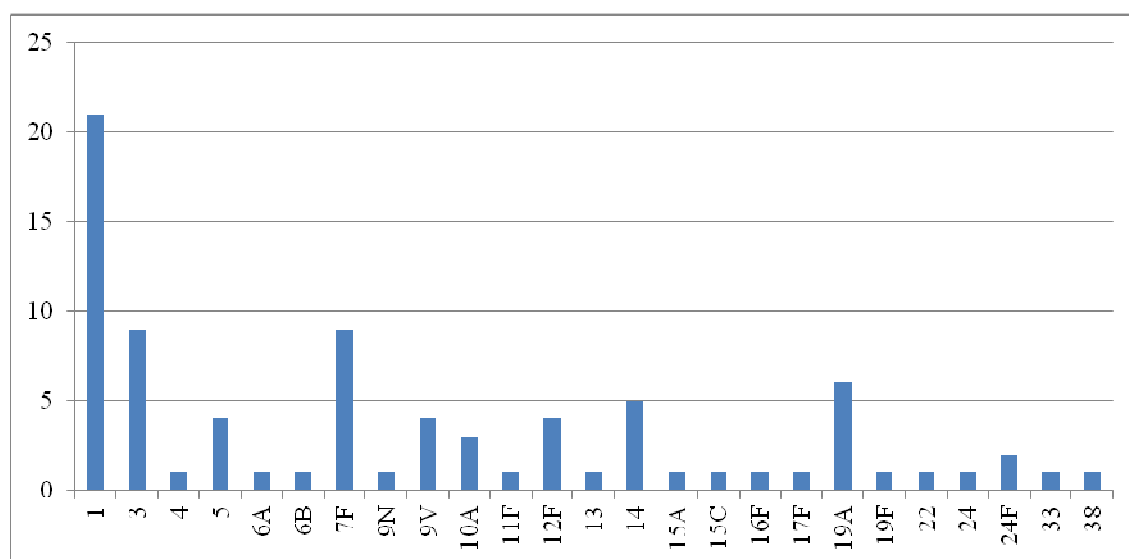
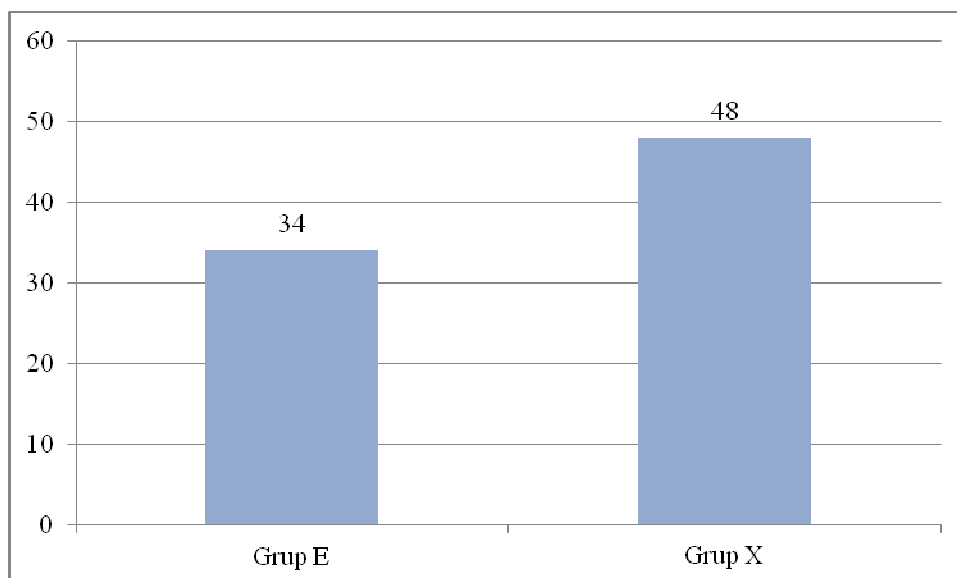


Figura 2: Distribució de tots els serotips aïllats d'*Streptococcus pneumoniae* per grups.



## BIBLIOGRAFIA

1. Ortqvist A, Hedlund J, Kalin M. Streptococcus pneumoniae: epidemiology, risk factors and clinical features. *Semin Respir Crit Care Med*. 2005; 563-574.
2. Shariatzadeh MR, Huang JQ, Tyrrell GJ, et al. Bacteremic pneumococcal pneumonia: a prospective study in Edmonton and neighboring municipalities. *Medicine (Baltimore)* 2005; 84:147–61.
3. Rosón B, Carratalà J, Dorca J, et al. Etiology, reasons for hospitalization, risk factors and outcomes of patients with community-acquired pneumonia hospitalized on the basis of conventional admission criteria. *Clin Infect Dis* 2001; 33:158–65.
4. Burman LA, Norrby R, Trollfors B. Invasive pneumococcal infections: incidence, predisposing factors, and prognosis. *Rev Infect Dis* 1985; 7: 133–142.
5. Feikin DR, Schuchat A, Kolczak M. Mortality from invasive pneumococcal pneumonia in the era of antibiotic resistance, 1995–1997. *Am J Public Health* 2000; 90:22
6. Pallarés R, Liñares J, Vadillo M, et al. Resistance to penicillin and cephalosporin and mortality from severe pneumococcal pneumonia in Barcelona, Spain. *N Engl J Med*. 1995; 333(8):474-80.
7. Henrichsen J, Konradsen HB, Nielsen SV, Skinhoj P. Increased occurrence of pneumococcal bacteremia in Denmark. *Ugeskr Laeger* 1997; 159 (23):3615–3616.
8. Kallénius G, Hedlund J, Svenson SB, Kalin M, Henrichsen J. Pneumococcal bacteraemia in Sweden. *Lancet* 1997; 349(9069):1910.

9. Giesecke J, Fredlund H. Increase in pneumococcal bacteraemia in Sweden. *Lancet* 1997; 349(9053):699–700.
10. Schonheyder HC, Sorensen HT, Kristensen B, Korsager B. Reasons for increase in pneumococcal bacteraemia. *Lancet* 1997; 349(9064):1554.
11. Harboe ZB, Benfield TL, Valentiner-Branth P, Hjuler T, Lambertsen L, Kaltoft M, Krogfelt K, Slotved HC, Christensen JJ, Konradsen HB. Temporal Trends in Invasive Pneumococcal Disease and Pneumococcal Serotypes over 7 Decades. *Clin Infect Dis*. 2010;50(3):329-37.
12. Ciruela P, Hernández S, Izquierdo C. Epidemiologia de la malaltia invasiva (Catalunya, 2001-2008). *Butlletí Epidemiològic de Catalunya* 2010; volum XXXI; 2, 31-37
13. Alanee SR, McGee L, Jackson D, Chiou CC, Feldman C, Morris AJ, Ortqvist A, Rello J, Luna CM, Baddour LM, Ip M, Yu VL, Klugman KP; International Pneumococcal Study Group. Association of Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* with Disease Severity and Outcome in Adults: An International Study. *Clin Infect Dis*. 2007;45(1):46-51.
14. Henrichsen J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2759-62.
15. Guckian JC, Christensen GD, Fine DP: The role of opsonins in recovery from experimental pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* 1980, 142(2):175-190.
16. Brueggemann AB, Griffiths DT, Meats E, Peto T, Crook DW, et al. (2003). Clonal relationships between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype- and clone-specific differences in invasive disease potential. *J Infect Dis* 187: 1424–1432.

17. Luján M, Gallego M, Belmonte Y, Fontanals D, Vallès J, Lisboa T, Rello J. Influence of pneumococcal serotype group on outcome in adults with bacteraemic pneumonia. *Eur Respir J*. 2010;36(5):1073-9.
18. Garcia-Vidal C, Ardanuy C, Tubau F, Viasus D, Dorca J, Liñares J, Gudiol F, Carratalà J Pneumococcal pneumonia presenting with septic shock: host- and pathogen-related factors and outcomes. *Thorax*. 2010;65(1):77-81.
19. Imöhl M, Reinert RR, Ocklenburg C, van der Linden M. Association of Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* with Age in Invasive Pneumococcal Disease. *J Clin Microbiol*. 2010;48(4):1291-6.
20. Bewick T, Sheppard C, Greenwood S, Slack M, Trotter C, George R, Lim WS Serotype prevalence in adults hospitalised with pneumococcal non-invasive community-acquired pneumonia. *Thorax* 2012; 67(6):540-5.
21. Harboe ZB, Thomsen RW, Riis A, Valentiner-Branth P, Christensen JJ, Lambertsen L, Krogfelt KA, Konradsen HB, Benfield TL. Pneumococcal Serotypes and Mortality following Invasive Pneumococcal Disease: A Population-Based Cohort Study. *PLoS Med*. 2009;6(5):e1000081.
22. Martens P, Worm SW, Lundgren B, Konradsen HB, Benfield T. Serotype-specific mortality from invasive *Streptococcus pneumonia* disease revisited. *BMC Infect Dis*. 2004;4:21.
23. Weinberger DM, Harboe ZB, Sanders EA, Ndiritu M, Klugman KP, Rückinger S, Dagan R, Adegbola R, Cutts F, Johnson HL, O'Brien KL, Scott JA, Lipsitch M. Association of Serotype with Risk of Death Due to Pneumococcal Pneumonia: A Meta-Analysis. *Clin Infect Dis*. 2010 Sep 15;51(6):692-9.